云 南 植 物 研 究 2010, 32 (5): 409～419
Acta Botanica Yunnanica DOI: 10.3724/SP.J.1143.2010.10076

重要生化反应“转移磷脂酰反应”的研究进展*

苏一兰[1,2,3]，文国松[1]，李唯奇[3**]
(1 云南农业大学农学与生物技术学院，云南 昆明 650201；2 红河学院农学系，云南 蒙自 661100；
3 中国科学院昆明植物研究所，云南 昆明 650204)

摘要：转移磷脂酰反应是在磷脂酶D的催化作用下，甘油磷脂和含羟基化合物发生碱基交换生成新的磷脂的反应。该反应为磷脂酶D所特有，被广泛的应用于动物、植物和微生物的脂类代谢、脂类信号研究以及重要生化制剂磷脂的合成工艺中。本文综述了转移磷脂酰反应的反应机制、影响因素、生物学作用及应用现状，讨论了深入研究这一反应所有待揭示的问题，并展望了今后的发展方向。
关键词：磷脂酶D；转移磷脂酰作用；磷脂酸
中图分类号：Q 545 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700(2010)05-409-11

The Research Progresses of Phospholipase D-mediated Transphosphatidylation*

SU Yi-Lan[1,2,3], WEN Guo-Song[1], LI Wei-Qi[3**]
(1 *College of Agronomy and Biotechnology Yunnan Agricultural University*, Kunming 650201, China;
2 *Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China;
3 *Department of Agronomy, Honghe University*, Mengzi 661100, China)

Abstract: Transphosphatidylation denotes the process of the head group exchange in glycerophospholipids which is mediated by Phospholipase D (PLD). This is one of an unique characteristics of PLD and has been well studied in the lipid metabolism, lipid signaling and synthesis of phospholipid of plants, animals and microorganisms. In this paper, the current knowledge on transphosphatidylation, mainly focusing on its catalytic mechanism, substrate specificity, and biological function had been concisely reviewed. Moreover, the future development of this issue had also been discussed.
Key words: Phospholipase D (PLD); Transphosphatidylation; Phosphatidic acid (PA)

转移磷脂酰反应（Transphosphatidylation）是指在磷脂酶D（Phospholipase D，PLD）的催化作用下，甘油磷脂的磷酸二酯键发生断裂，其上连接的碱基与含羟基化合物发生碱基交换反应，形成新的甘油磷脂和新的羟基化合物（图1）（Wang等，1994；Munnik等，1995；Mansfeld and Ulbrich-Hofmann，2009）。上世纪60年代初，Ferrari和Sastry等在研究植物磷脂的生物合成和代谢时，先后发现了转移磷脂酰反应（Ferrari and Benson，1961；Sastry and Kates，1965）。几乎在同一时期，这一反应也在动物中被发现，但是催化这一反应的酶并没有得到确认。1966年，Douce等（1966）用乙醇对莴苣、甘蓝和红树进行磷脂提取时发现，磷脂酰乙醇（Phosphatidylethanol，PtdEt）是提取物中含量最高的一种脂类，而磷脂酰甘油（Phosphatidyl-

* 基金项目：国家自然科学基金 NSFC (30670474；30870571)
** 通讯作者：Author for correspondence; E-mail: weiqili@mail.kib.ac.cn; Tel: 0871-5223025
收稿日期：2010-04-12，2010-05-17 接受发表
作者简介：苏一兰（1981－）女，在读硕士研究生，主要从事植物抗逆机制研究。

glycerol，PG）和磷脂酰胆碱（Phosphatidylcholine，PC）这两种天然磷脂的含量则异常的低。然而，在提取前先将植物材料进行干燥，提取物中没有了 PtdEt，其他脂类的含量正常。这一结果表明，在用乙醇提取磷脂时，PG 和 PC 与乙醇之间发生了转移磷脂酰反应，生成了 PtdEt。而将植物材料干燥后再进行提取则没有 PtdEt 生成，可推断催化转移磷脂酰反应的酶在干燥过程中已失活，Yang 等（1967）证实了催化这一反应的酶是磷脂酶 D（Phospholipase D，PLD，EC3.1.4.4）。PLD 是普遍存在于植物、动物和微生物中的一种重要的磷脂水解酶，在植物的各个部位（根、茎、叶、种子等）中均有广泛分布。PLD 在细胞信号转导、细胞骨架重排、膜转运、膜降解等过程中起着重要作用，广泛参与植物响应环境胁迫的信号过程（Bargmann and Munnik，2006；Wang 等，2006）。

参与转移磷脂酰反应的两种物质是甘油磷脂和其它含羟基化合物，产物是形成新的甘油磷脂（图 1）。甘油磷脂也称磷酸甘油脂或磷脂，是由磷脂酸衍生而来。磷脂酸的磷酸根被一个极性醇（X-OH）酯化，形成各种常见的甘油磷脂。X-OH 一般为含氮碱，如胆碱（choline）、乙醇胺（ethanolamine）、丝氨酸（serine）等，此外是肌醇（inositol）、甘油（glycerol）和糖分子（王镜岩等，2002）。甘油磷脂分子的磷酸根与这些酯化的醇部分一起构成极性头部，两条长的烃链组成非极性尾部。甘油磷脂的磷酸二酯键在 PLD 的催化下和含羟基的化合物发生碱基交换反应。磷脂酰基受体包括水、甲醇、乙醇、乙醇胺、甘油、丝氨酸、溶血磷脂等。当水分子作为底物时，其产物为磷脂酸（Phosphatidic acid，PA）和有机碱，这一反应称为 PLD 的水解作用。当与其它含羟基化合物发生反应时，形成新的磷脂和新的羟基化合物，这一特异反应称为 PLD 的“转移磷脂酰作用”（Wang 等，1994）。通常地，当羟基化合物存在时，转移磷脂酰反应优先于水解反应（图 1）。

这一反应在发现之初就被广泛运用于磷脂合成工艺（Ulbrich-Hofmann 等，2005）。上世纪 90 年代随着 PLD 在植物、哺乳动物及真菌细胞中重要生理作用的认识，人们开始关注和研究 PLD

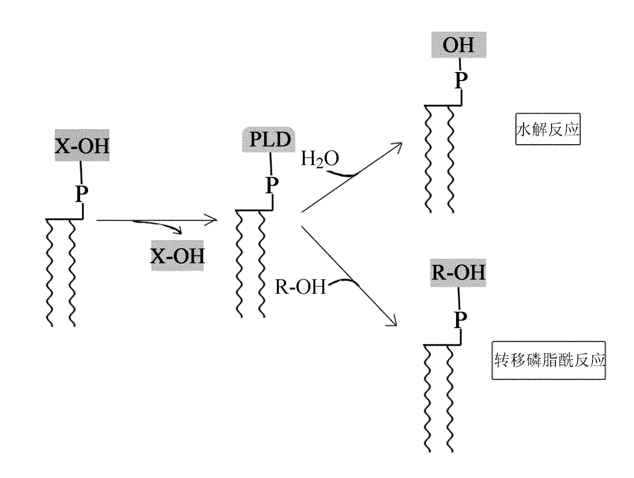


图 1 PLD 催化磷脂碱基交换反应和水解反应
（X-OH 表示极性头基团；R-OH 表示羟基化合物）
Fig. 1 Scheme for transphosphatidylation and hydrolysis of glycerophospholipids by PLD
（X-OH represents a polar head group; R-OH represents hydroxy compound）

在动植物中的活性（Morris 等，1997），对 PLD 介导的转移磷脂酰的生理作用和水解作用也展开了深入全面的探究。本文对转移磷脂酰作用的发生机制、反应特性以及生物学意义进行了综述。

1 PLD 的结构及催化转移磷脂酰的反应机制

1.1 PLD 家族及其催化反应的必要元件

1947 年 Hanahan 等（1947）首次在胡萝卜根和白菜叶中发现 PLD。至今，在 NCBI（美国国立生物技术信息中心）的 GenBank 中收录的 PLD 基因已超过千余条，几乎所有具有 PLD 活性的酶的氨基酸序列都已知，它们组成了庞大的 PLD 家族。在拟南芥中编码 PLD 的基因至少有 12 条，它们被分为 5 类，分别是 PLDα、PLDβ、PLDγ、PLDδ 和 PLDζ（Qin and Wang，2002）。除 PLD 外，PLD 家族还包括大肠杆菌的心磷脂合酶和磷脂酰丝氨酸合酶（Morris 等，1996）、沙门氏菌的核酸内切酶、天花病毒套膜蛋白（Ponting and Kerr，1996）、人类酪氨酸 DNA 磷酸二酯酶（Interthal 等，2001）。它们最大的共同特征是都具有两个相似的被称为“HKD”的基序，即“组氨酸 X 赖氨酸 XXXX 天冬氨酸”（HXKXXXXDXXXXXXG（G/S））。HKD 基序是 PLD 催化活性的必要元件，当改变组氨酸和赖氨酸残基时，白菜（Lee 等，1989）和链霉菌

（Secundo 等，1996）PLD 活性丧失。除了 HKD 基序，PLD 家族还具有另外几个同源区域（Ⅰ-Ⅳ）（Sung 等，1997），两个 HKD 基序分别位于区域Ⅱ和Ⅳ（图 2）。链霉菌属 PLD 具有保守的区域Ⅱ和Ⅳ及部分保守区域Ⅰ。而 PX 和 PH 区域则是哺乳动物和真菌 PLD 所特有，大多数植物 PLD 则在 N 端具有 C2 区域。完整的 C-端结构是哺乳动物和植物不可缺少的一部分。在链霉菌突变体研究中发现，C-端环状结构上的丙氨酸和赖氨酸残基与催化反应底物选择有关（Uesugi 等，2005，2007）。

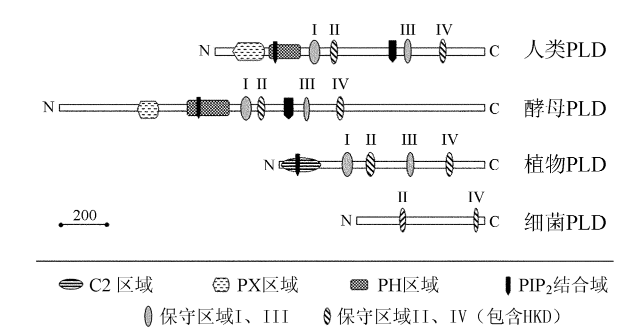


图 2　图示 PLD 保守区域结构（Ulbrich-Hofmann，2005）
Fig. 2　Domain structures of representatives of PLDs (Ulbrich-Hofmann，2005)

1.2　PLD 的三级结构

尽管在动植物中发现 PLD 已近 70 年，但只有两种来自链霉菌属的 PLD（Streptomyces sp. strain PMF，PMFPLD 和 Streptomyces antibioticus）的三级结构得到阐明（Leiros 等，2000）。如图 3 所示，PLD 是由两个相似的拓扑结构组成的单体蛋白质，包含 35 个二级结构元件，其中由 17 条 β 股构成的两个 β 折叠片包裹在 18 个 α 螺旋元件中。此外，在 PLD 分子表面还有一些延伸出来的环状结构，其中一个由 382～389 个氨基酸残基构成的区域在大多数链霉菌属 PLD 中是保守的，因此被看作是界面接触区域。PLD 活性位点就处于两个拓扑结构单元的界面处，由两个高度保守的 HKD 氨基酸基序构成（Ulbrich-Hofmann 等，2005）。

1.3　PLD 催化转移磷脂酰反应的机制

由于在原核生物与真核生物之间没有 PLD 的同源异构体，很难从已知的链霉菌 PLD 三级结构来推导植物及哺乳动物的 PLD 三级结构，

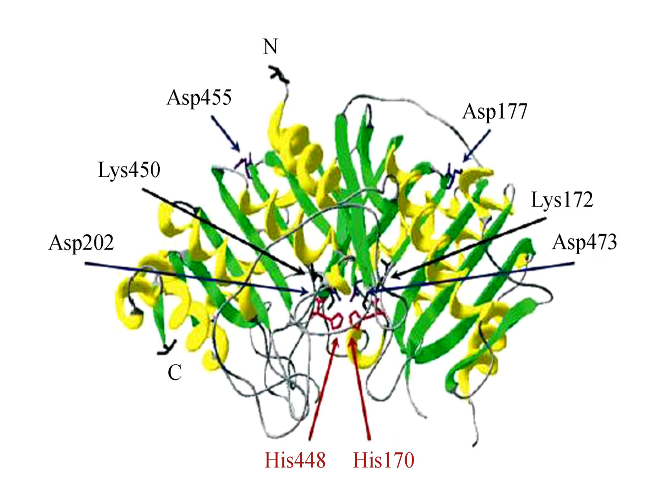


图 3　PMFPLD（Streptomyees sp. Strain PMF）的三级结构（Ulbrich-Hofmann，2005）
Fig. 3　Tertiary structure of PLD from Streptomyces sp. strain PMF edited with Swiss-Pdb Viewer (Ulbrich-Hofmann，2005)

但是根据已知的链霉菌 PLD 的三级结构可推测出酶作用活性位点。最近，Leiros 等（2004）通过对链霉菌 PLD 晶体结构的研究后推断出 PLD 催化磷脂反应机制的模式。其反应模式与 2000 年 Ulbrich-Hofmann 提出的“乒乓反应”机制一致（图 4）。首先，His170 的亲核中心攻击底物磷脂的亲电中心，形成不稳定的共价中间复合物（磷酰酶）。在 His448 的质子化作用下，磷脂的极性醇获得氢离子，形成羟基化合物（X_1OH）。第二底物（X_2OH）受体醇或水在 His448 的去质子化作用下脱氢后结合到磷酰基上形成新的磷脂。

从该模式中可看出，转移磷脂酰反应中羟基底物和水分子互为竞争者。因此，不同来源的 PLD，由于其化学结构和两个 HKD 基序空间结构不同，其发生转移磷酰基反应的潜能也不相同。Lerchner 等（2005）通过对甘蓝和罂粟的 PLD 研究发现，细微的氨基酸残基的改变可导致 PLD 催化水解反应和转移磷酰基反应活性的剧烈变化。其次，反应底物和反应体系的不同也直接影响着 PLD 催化反应的活性。

2　转移磷脂酰反应的调控因素

2.1　底物特征

转移磷脂酰反应的底物包括供体（磷脂）及受体（含羟基化合物）。底物磷脂包括磷脂酰胆

图 4　PLD 催化反应机制（水解反应中，X_2＝H）(Ulbrich-Hofmann，2003)

Fig. 4　Hypothetic mechanism of PLD-catalysed transphosphatidylation or hydrolysis (X_2＝H in case of hydrolysis) (Ulbrich-Hofmann，2003)

碱（PC）、磷脂酰乙醇胺（phosphatidylethanolamine，PE）、磷脂酰甘油（PG）、磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine，PS）、磷脂酰肌醇（phosphatidylinositides，PI）、溶血磷脂酰胆碱（lyso-PC）、心磷脂（Cardiolipin）和缩醛磷脂（Plasmalogens）等（Pappan and Wang，1999）。磷脂的物理状态、头基团结构、脂肪酸链的不饱和度以及 sn-2 位置的空间构象都是影响底物选择的因素（Bugaut 等，1985；Abousalham 等，2004；Sato 等，2004）。当底物磷脂呈胶束态（micelle-forming）时，PLD 具有较高活性（Lambrecht and Ulbrich-Hofmann，1992），而当磷脂呈囊泡（vesicle）态时，PLD 活性均低于胶束态和单体态（monomer）（Yang and Roberts，2003）。而相对于单体底物，聚合态底物更能激发 PLD 的活性。聚合态底物的几何结构是影响 PLD 催化反应的重要因素，然而，PLD 活性与底物形态间的相互关系还未得到全面阐明。

而受体的分子结构、极性等也影响着转移磷脂酰反应的底物选择和反应速率。Hirche and Ulbrich-Hofmann（2000）用卷心菜 PLD 和链霉菌 PLD 研究转移磷脂酰反应中反应体系、受体醇与 PLD 来源之间的相互关系，对比它们在甘油、正丁醇和胆碱类似物三种受体醇下，催化 PC 发生转移磷脂酰反应和水解反应的活性。在乙醚和正己烷两种体系下，受体醇的亲水或疏水特性是影响转移磷脂酰反应和水解反应比例的重要因素。在正己烷体系中，正丁醇优先作为转移磷脂酰反应的底物，而甘油则只有在体系中加入少量仲丁醇作为调节剂时才发生转移磷脂酰反应。他们还发现，受体醇分子结构上（如 N-杂环）微小的变化，都会导致两个反应比例的巨大变化。Dippe 和 Ulbrich-Hofmann（2009）对卷心菜和罂粟的 PLD 研究发现，在乙醚反应体系中，受体醇不同，PC 发生转移磷脂酰反应时头基团交换速率不同，但对受体醇表现出相同的偏好，体现出乙醇胺优先于甘油和丝氨酸。

2.2　底物识别

一般认为，反应底物的结构是影响 PLD 催化活性的最主要因素（Hirche and Ulbrich-Hofmann，1999），而不同来源的 PLD 对底物的识别机制则是影响转移磷脂酰反应和水解反应比的关键因素（Hirche and Ulbrich-Hofmann，2000）。植物（Lerchner 等，2006）和哺乳动物（Liu 等，2001；Xie 等，2001）PLD 的一个共同特征是需要具备一个完整的 C-端才能具有活性。来自罂粟的两个 PLD 仅有 11 个氨基酸残基不同，但表现出不同的转移磷脂酰反应能力（Lerchner 等，2005）。通过对突变体（链霉菌株系 TH-2）研究表明，C-端的两个氨基酸残基 Ala426 和 Lys438 与 PLD 催化转移磷脂酰反应和水解反应时底物选择有关。Hagishita 等（2000）也发现链霉菌株系 TH-2 的 PLD（TH-2PLD）相比放射菌类表现出更高的转移磷脂酰反应活力。尽管 TH-2PLD 和已知的链霉菌 PLD 在氨基酸序列上有 70% 的同源性，但是两种 PLD 表现出不同的转移磷脂酰反应活力，以及不同的转移磷脂酰反应与水解反应比。这个发现暗示着除了两个 HKD 基序外的氨基酸残基也与磷脂的识别有关，并且影响着转移磷脂酰反应的

底物选择性。

最近，Uesugi 等（2005，2007）发现，TH-2PLD 的两个区域（氨基酸残基 188～203 和 425～442）与催化反应和底物识别有关。基于对 PMFPLD 三级结构的认识，这两个区域位于两个活性位点 HDK 的几何入口位置。经深入研究表明，Gly188、Asp191、Ala426 和 LYS438 是 TH-2PLD 识别底物的几个关键氨基酸残基。其中 Asp191 和 LYS438 暴露于活性位点外部，直接与反应体系的溶剂接触，而 Gly188 和 Ala426 位于内部。

Ogino 等（2007）最近也在肉桂链轮丝菌（*Streptoverticillium cinnamoneum*）的 PLD 中发现，位于“HKD”基序下游的两个基序“氨基乙酸－氨基乙酸，GG”和“氨基乙酸－丝氨酸，GS”是影响转移磷脂酰反应的重要基序。三个突变体 G215S，G216S 和 G216S-S489G 均表现出高于野生型 9 至 27 倍的以 PC 为底物的转移磷脂酰反应。与 PMFPLD 三级结构比较后发现，催化活性位点位于整个分子中心隙口的底部，被“HDK”和“GG/GS”基序覆盖着。他们推断，“GG/GS”基序控制着中心隙口的构造或开闭，从而影响着 PLD 催化活性位点与底物之间的接触。

Masayama 等（2008）将抗生链霉菌（*Streptomyces antibioticus*）HKD 基序上 His168 和 His42 周围的 Trp187、Tyr191 和 Tyr385 分别替换为 Phe、Arg 和 Tyr 构建了突变体，经实验发现，在大量混合液中，环己醇优先作为底物发生转移磷脂酰反应，而以 PC 为底物的水解反应的比例则远远低于野生型。结合 Uesugi 的结果可以得出，抗生链霉菌 PLD 的 Trp187 和 Tyr191 对应的是 TH-2PLD 的 Trp189 和 Tyr193，从而进一步证实 N 端的自由环区域负责磷脂的识别。

2.3 其它

反应体系、钙离子浓度、pH 值等也是影响转移磷脂酰反应的因素。为了使转移磷脂酰反应的底物和产物更好的溶解，又不需要添加额外的表面活性剂，合成磷脂时，转移磷脂酰反应通常在乳状液体系中进行，包含溶解磷脂的有机相，如乙醚或乙酸乙酯，以及溶解受体醇和酶的水相。由于底物磷脂成聚合态时能更好的激发 PLD 的活性，因此有机/水两相体系对于转移磷脂酰反应是有促进作用的。

钙离子是大多数植物 PLD 发挥活性的重要辅助因子，植物 PLD 最适的钙离子浓度一般均较高，达 20～100 mmol·L^{-1}。而对于链霉菌 PLD，钙离子并不是必需的，可能与链霉菌 PLD 缺少 N-端调节区域有关（Heller，1978）。pH 值对 PLD 活性的影响依赖于钙离子浓度以及 PLD 的不同类型。Pappan 和 Wang（1999）发现，PLDα 在低浓度的钙离子下，需要酸性环境（pH4.5～5.5）才能发挥最大活性，而 PLDβ 和 PLDγ 在相同钙离子浓度下，只有在中性环境才能具备活性。

3 转移磷脂酰反应的生物学作用

3.1 动物方面

转移磷脂酰反应在动物中的生物学作用主要体现于利用转移磷脂酰反应探究乙醇对动物组织或器官的伤害机制和 PLD 在伤害过程中的作用，以及对转移磷脂酰反应异常引起的疾病的致病机理研究。在乙醇的浸入下，动物细胞中大量的磷脂发生转移磷脂酰反应，形成磷脂酰乙醇（PtdEt），PtdEt 被认为是造成磷脂代谢混乱的原因之一（Kobayashi and Kanfer，1987；Gustavsson，1995；Rydzewska 等，1996）。PtdEt 可通过增加膜流动性而改变膜的物理化学特性，它对与膜相连的两种酶有相反的作用，削弱 Na^+/K^+-ATP 酶的活性，而增强 5 核苷酸酶的活性（Omodeo-Sale 等，1991）。PtdEt 还可作为磷脂酰丝氨酸的取代物激活大脑 PKCγ，从而改变原有的激活模式（Asaoka 等，1988）。Kötter 等（2000）发现乙醇和正丁醇抑制了 PKC 活性、阻断了 PLD 信号通路，造成大鼠脑皮质星形胶质细胞增殖受阻。这一发现将有助于揭示酗酒引起的胚胎发育不良的原因。以上实验结果及推测暗示着由 PLD 介导的转移磷脂酰反应可能是导致由乙醇引发的疾病的起因。

另外，van Blitterswijk 和 Hilkmann（1993）发现由 PLD 催化 PC 与甘油二酯发生转移磷脂酰反应生成的 bis-PA 与激活人类纤维原细胞血管缓激肽有关。Nakamura 等（1994）发现，山梨醇的不正常积累引发了转移磷脂酰反应，生成磷

脂酰一山梨醇，而这种异常的磷脂的产生改变了膜脂质体的代谢，从而导致糖尿病的发生。而转移磷脂酰反应异常可能是导致的糖尿病心肌症（Moraru，1992）及心肌缺血再灌注损伤（Williams，1995）的原因。

3.2 植物、微生物方面

尽管在植物和微生物中，转移磷脂酰反应的生物学作用仍没有得到具体的体现，但随着研究工作的深入和一些有意义的现象的发现，转移磷脂酰反应的生物学作用正渐渐的得到挖掘。Walton and Goldfine（1987）发现梭菌属 PLD 催化的转移磷脂酰反应与膜磷脂重建有关。Dhonukshe 等（2003）用正丁醇处理烟草 BY-2 细胞时发现，转移磷脂酰反应导致了细胞骨架重组，且不同来源的 PLD 具有不同的转移磷脂酰反应的潜能，PLD 同功酶对底物具有立体选择性。这些都暗示着以牺牲重要信号物质——磷脂酸（PA）为代价，而发生转移磷脂酰反应，这一机制必定具有重要的生理作用。在植物中，一般认为水的含量比羟基化合物高 50 倍时，转移磷脂酰反应仍然存在很高的活性。PLD 在一些微生物中表现出更高比例的转移磷脂酰反应活性。来自甘蓝中的 PLD2 和来自链霉菌（*Streptomyces* sp.）的 PLD 表现出相似的水解能力，但在同样的处理下，链霉菌 PLD 催化磷脂酰胆碱（PC）转化为磷脂酰乙醇胺（PE）的能力比甘蓝 PLD2 高出 24 倍，而链霉菌 PLD 几乎没有水解产物磷脂酸（PA）生成（Dippe 等，2008）。

造成不同来源 PLD 以及 PLD 家族不同成员之间催化转移磷脂酰反应潜力差异的原因和生物学意义何在，仍需进一步探究。尽管如此，研究者还是在一些微生物和动物 PLD 上发现了有意义的现象。色褐链霉菌（*Streptomyces chromofuscus*）PLD 是一种钙离子依赖型酶，且转移磷脂酰反应能力较弱。但以天然存在的羟基化合物甘油二酯作为受体底物时，在色褐链霉菌 PLD 的催化下发生了转移磷脂酰反应，反应形成的新磷脂（磷脂酰一醇）可以直接被 PLD 再水解而生成 PA。而钙离子能够引起含 PA（Papahadjopoulos 等，1976）、磷脂酰丝氨酸（Wilschut 等，1981）及心磷脂（Vail and Stollery，1979）等含负电荷磷脂脂质体膜间的融合（Creutz 等，1979）。因此，由于转移磷脂酰反应的发生使 PA 的量相对较少，进而促进了水解反应的发生，而水解反应产物 PA 在钙离子的作用下与寄主细胞的脂质体间发生膜融合，所以由色褐链霉菌 PLD 催化的这一系列反应促进了细菌和寄主细胞之间的膜融合，可看出，磷脂酰一醇作为细菌侵染真核细胞的重要生理作用（El-Kirat 等，2003）。

3.3 丁醇对植物的生理作用

由于 PLD 的转移磷脂酰反应这一特性，研究者们通常使用醇类物质作为 PA 经 PLD 途径生成的抑制剂来探究 PLD 的功能。在植物中常用的是正丁醇，当正丁醇存在时，优先于水作为 PLD 的催化底物，通过转移磷脂酰反应生成磷脂酰丁醇，由于 PA 的合成受阻，使得正丁醇处理后出现了各种生理上的抑制或变化。在拟南芥中发现，一定浓度的正丁醇处理后，出现胚根伸出延迟、子叶发育受抑制和萌发率降低，子叶在形态上较正常的显得更圆。正丁醇处理对拟南芥幼苗生长也表现出根生长速率降低，初生根生长受抑制的作用。根部细胞学观察发现，正丁醇处理后，根尖细胞活力降低；根毛区，短而膨胀的根毛数量增加，有的则形成分叉的根毛。在伸长区可观察到明显的肿胀，根细胞排列不规则（Gardiner 等，2003）。同时，正丁醇的处理对细胞骨架的影响也是十分明显的。在拟南芥（Motes 等，2005）、烟草 BY-2 细胞（Dhonukshe 等，2003；Hirase 等，2006）、藻类（Peters 等，2007）等的研究中均发现，正丁醇处理后，拟南芥胚轴和子叶的微管发生解聚，而根伸长区微管则出现排列混乱、片段化现象。分生区细胞形成大液泡，肌动蛋白纤维成束状聚集在细胞核周围，胚轴和子叶的表皮细胞肌动蛋白纤维同样成束状。在烟草 BY-2 细胞中同样发现周质微管在正丁醇的处理下发生片段化，解聚的现象。随着研究的不断深入，人们发现正丁醇对植物生理作用的影响不仅限于上述情况。正丁醇的处理对花粉萌发、花粉管生长（Potocky 等，2003）及水杨酸应答途径（Krinke 等，2009）等同样有抑制和阻碍作用（表 1）。然而有趣的是在以上研究中均发现，正丁醇的两个同分异构体（仲丁醇和叔丁醇）在以上处理中几乎没有表现出类似正

丁醇的处理结果。Munnik（1995）曾对此作了研究，发现醇类物质既可作为 PLD 催化转移磷脂酰反应的底物，也可通过 G-蛋白激活 PLD 活性，然而碳链长度及羟基位置决定了其所扮演的角色和潜力（图 5）。

碳链越长，其参与转移磷脂酰反应能力和激活 PLD 能力越强。而当碳链长度相同时，羟基所在位置则成为另一关键因素。正丁醇和异丁醇可同时作为反应底物和激活剂；仲丁醇也可激活 PLD 活性，但不能作为反应底物；叔丁醇既不能作为激活剂，也不能充当反应底物。可看出，羟基越是靠近碳链边缘，其参与转移磷脂酰反应的潜力越大。因此以上实验中，仲丁醇和叔丁醇处理后，没有发生转移磷脂酰反应，也就没有阻碍了重要第二信使 PA 的生成，也就没有对植物造成生理上的影响。

4　转移磷脂酰作用的应用现状

目前，转移磷脂酰反应的应用可分为两类。第一类，利用 PLD 所特有的转移磷脂酰反应作为度量 PLD 活性的手段，进而对哺乳动物、植物和微生物 PLD 在细胞信号转导中的作用和功能进行研究。由于羟基化合物存在时，优先于水作为 PLD 催化反应的底物，因此羟基化合物被视为 PLD 水解反应的抑制剂。利用这一特性，可通过人为添加醇（如正丁醇）来抑制 PLD 活性，以研究 PLD 的在特定处理下的功能。Peters 等（2007）为了研究 PLD 在褐藻（*Silvetia compressa*）细胞骨架和内膜排列信号通路中的调节机制，采用正丁醇作为 PLD 的抑制剂对褐藻合子进行处理后发现，细胞分裂和细胞浆移动被抑制，微管排列被打乱，合子发育停滞在中期，这些现象表明微管的活动直接受 PLD 的信号调节。

表1　正丁醇对植物生理作用的影响

Table 1　The effect of 1-butanol on physiology in plant

处理类型	表型	植物物种	参考文献
萌发	萌发时间延迟，萌发率降低。	拟南芥	
根生长	抑制初生根生长，根生长速率降低。	拟南芥	
子叶形态	比正常子叶，形态上显得更圆。	拟南芥	
根毛形态	根尖细胞活力降低。 伸长区，明显的肿胀，细胞排列不规则。 根毛区，短而膨胀的根毛数量增加，有的则形成分叉的根毛。	拟南芥	Gardiner 等，2003
细胞骨架	微管排列混乱，片段化，解聚。 肌动蛋白纤维成束状聚集在细胞核周围。	拟南芥、 褐藻、 烟草 BY-2 细胞	Motes 等，2005 Peters 等，2007 Hirase 等，2006
细胞分裂	细胞分裂和细胞浆移动被抑制，合子发育停滞。	拟南芥 褐藻	Motes 等，2005 Peters 等，2007
花粉及花粉管	阻碍花粉萌发，抑制花粉管生长	烟草	Potocky 等，2003
水杨酸反应途径	抑制两个水杨酸响应基因的表达	拟南芥悬浮细胞	Krinke 等，2009

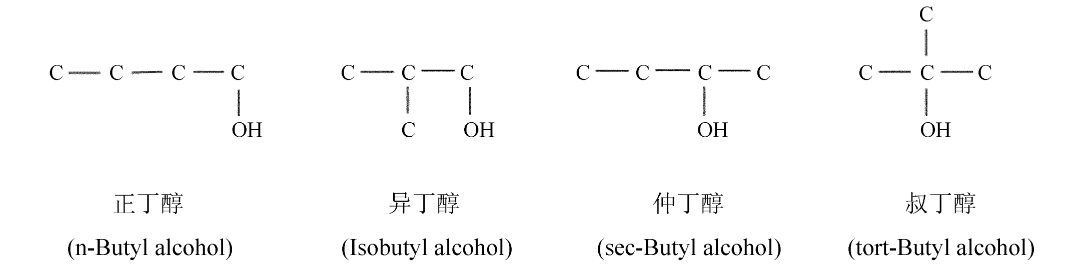


图 5　丁醇的四个同分异构体结构式

Fig. 5　The structural formula of different ButOH isomers

另一类则着重微生物和植物 PLD 作为生物催化剂在磷脂合成工艺中的应用研究。这类研究主要集中在 PLD 的催化反应效率，底物结构和反应体系的影响，转移磷脂酰反应和水解反应比，以及 PLD 在细胞外的稳定性等。微生物 PLD 的发现使转移磷脂酰反应用于规模化合成磷脂成为了现实。80 年代起，国外的学者纷纷报道了利用 PLD 的转移磷脂酰反应制备和合成高纯度的多功能特性的单一磷脂及稀少磷脂，如肌醇磷脂（Rakhimov，1989）、卵磷脂（Fukuda and Hideki，1990）、丝氨酸磷脂（Fujita and Kenichi，1989）、甘油酰磷脂、心磷脂（Kudo and Satoshi，1988，1989）、磷脂酰葡萄糖（Tsunoda and Akira，1988）、磷脂酰-D-丝氨酸（Kokusho and Mitatka，1988）。在医药工业中，利用 PLD 的碱基转移活性可将一些多肽、核苷和多糖类药物通过配位键连接在磷脂载体上，制成具有特殊疗效作用的脂质体。利用 PLD 还可合成一些抗肿瘤试剂，从而为抗肿瘤药物的酶法合成开辟了新的方向。

5 展望

目前，转移磷脂酰反应作为生产磷脂的途径已在食品业、医药工业发挥着重要的作用，链霉菌 PLD 和甘蓝 PLD 被认为是最佳催化剂。随着对转移磷脂酰反应研究的不断深入，具有更强转移磷脂酰反应催化能力的 PLD 将被发现和利用，这将进一步提高磷脂合成效率。对底物识别、反应体系控制等影响因素的深入探究，也将大大促进磷脂合成工艺体系的优化。同样在实验室研究中，转移磷脂酰反应对于揭示 PLD 重要功能和作用也有不可磨灭的功劳。尽管如此，PLD 家族成员庞大、编码基因较多，加上 PLD 复杂的调控机制和生物学功能，要进一步理解转移磷脂酰反应中的具体机制和生物学效应，还需要更多的研究。首先，醇类物质（如正丁醇）的生物学效应是否完全通过转移磷脂酰反应达到的，还需要分子遗传学证据；如何利用转移磷脂酰反应获得有益的生物学效应；能否以及如何调控转移磷脂酰反应等。其次，在 PLD 众多家族成员中，我们需要弄清具体是哪个酶直接介导了转移磷脂酰反应，及其调控基因，是否还存在其它调节因子。最后，动物、植物或微生物在受到醇类物质伤害时，PLD 催化的转移磷脂酰反应及其产物的下游活动如何影响细胞中的其它酶和器官（如微管、膜系统等）。上述问题的解决，将会使转移磷脂酰反应的广泛生物学作用研究向前迈进一大步，并推进 PLD 生物学作用的更深入研究，将其作为相关疾病治疗的新靶点成为可能。

〔参 考 文 献〕

王镜岩，朱圣庚，徐长法，2002. 生物化学上册. 第 3 版［M］. 北京：高等教育出版社，102—103

Abousalham A，Nari J，Teissère M *et al*.，2004. Study of fatty acid specificity of sunflower phospholipase D using detergent/phospholipid micelles［J］. *European Journal of Biochemistry*，**248**：374—379

Asaoka Y，Kikkawa U，Sekiguchi K *et al*.，1988. Activation of a brain-specific protein kinase C subspecies in the presence of phosphatidylethanol［J］. *FEBS Letters*，**231**：221—224

Bargmann BO，Munnik T，2006. The role of phospholipase D in plant stress responses［J］. *Current Opinion in Plant Biology*，**9**：515—522

Bugaut M，Kuksis A，Myher J，1985. Loss of stereospecificity of phospholipases C and D upon introduction of a 2-alkyl group into rac-1，2-diacylglycero-3-phosphocholine［J］. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*，**835**：304—314

Creutz C，Pazoles C，Pollard H，1979. Self-association of synexin in the presence of calcium. Correlation with synexin-induced membrane fusion and examination of the structure of synexin aggregates［J］. *Journal of Biological Chemistry*，**254**：553

Dhonukshe P，Laxalt AM，Goedhart J *et al*.，2003. Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells［J］. *The Plant Cell*，**15**：2666—2679

Dippe M，Ulbrich-Hofmann R，2009. Substrate specificity in phospholipid transformations by plant phospholipase D isoenzymes［J］. *Phytochemistry*，**70**：361—365

Dippe M，Mrestani-Klaus C，Schierhorn A *et al*.，2008. Phospholipase D-catalyzed synthesis of new phospholipids with polar head groups［J］. *Chemistry and Physics of Lipids*，**152**：71—77

Douce R，Faure M，Marechal J，1966. Compt［J］. *Rend*，**262**：1549

ElKirat K，Prigent AF，Chauvet JP *et al*.，2003. Transphosphatidylation activity of Streptomyces chromofuscus phospholipase D in biomimetic membranes［J］. *European Jour-*

nal of Biochemistry, **270**: 4523

Ferrari RA, Benson AA, 1961. The path of carbon in photosynthesis of the lipids [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **93**: 185—192

Fujita, Kenichi, 1989. Conversion of Phosphatidylcholine to Phosphatidylserine by Phospholipase D in Micelle and Emulsion Systems [P]. *Japanese Kokai Tokkyo Koho*, JP63 36, 792

Fukuda K, Hideki E, 1990. Phospholipid Preparation with Enzyme [P]. *Japanese Kokai Tokkyo Koho*, 381

Gardiner J, Collings DA, Harper JDI *et al.*, 2003. The effects of the phospholipase D-antagonist 1-butanol on seedling development and microtubule organisation in Arabidopsis [J]. *Plant and Cell Physiology*, **44**: 687—696

Gustavsson L, 1995. Phosphatidylethanol formation: specific effects of ethanol mediated via phospholipase D [J] *The Medical Council on Alcohol*, 391—406

Hanahan DJ, Chaikoff IL, 1947. A new phospholipid-splitting enzym specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping [J]. *Journal of Biological Chemistry*, **169**: 699—705

Hagishita T, Nishikawa M, Hatanaka T, 2000. Isolation of phospholipase D producing microorganisms with high transphosphatidylation activity [J]. *Biotechnology Letters*, **22**: 1587—1590

Heller M, 1978. Phospholipase D [J]. *Advances in Lipid Research*, **16**: 267—326

Hirase A, Hamada T, Itoh TJ *et al.*, 2006. n-butanol induces depolymerization of microtubules in vivo and in vitro [J]. *Plant and Cell Physiology*, **47**: 1004—1009

Hirche F, Ulbrich-Hofmann R, 1999. The interfacial pressure is an important parameter for the rate of phospholipase D catalyzed reactions in emulsion systems [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1436**: 383—389

Hirche F, Ulbrich-Hofmann R, 2000. The interdependence of solvent, acceptor alcohol and enzyme source in transphosphatidylation by phospholipase D [J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, **18**: 343—353

Interthal H, Pouliot J, Champoux J, 2001. The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**: 12009

Juneia LR, Hibi N, Yamane T *et al.*, 1987. Repeated Batch and continuous operation for phosphatidylglycerol synthesis from phosphatidylcholine with immobilized phospholipase D [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, **27** (2): 146—151

Kötter K, Jin S, Klein J, 2000. Inhibition of astroglial cell proliferation by alcohols: interference with the protein kinase C-phospholipase D signaling pathway [J]. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **18**: 825—831

Kobayashi M, Kanfer JN, 1987. Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylation by rat brain synaptosomal phospholipase D [J]. *Journal of Neurochemistry*, **48**: 1597—1603

Kokusho, Mitatka, 1988. A Comparative Study on Conversion Phosphatidylcholine to Phosphatidylserine with Immobilized Phospholipase D [P]. *Japanese Kokai Tokkyo Koho*, JP63 123, 389

Krinke O, Flemr M, Vergnolle C *et al.*, 2009. Phospholipase D activation is an early component of the salicylic acid signaling pathway in Arabidopsis cell suspensions [J]. *Plant Physiology*, **150**: 424—436

Kudo, Satoshi, 1989. Phospholipid Derivatives [P]. *Japanese Kokai Tokkyo Koho*, JP01 219, 80, 285

Lambrecht R, Ulbrich-Hofmann R, 1992. A facile purification procedure of phospholipase D from cabbage and its characterization [J]. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 373, 81

Lee H, Choi M, Koh E, 1989. Purification and characterization of the active site of phospholipase D [J]. *Korean Biochemical Journal* J 22, 487—493

Leiros I, McSweeney S, Hough E, 2004. The reaction mechanism of phospholipase D from *Streptomyces* sp. strain PMF. Snapshots along the reaction pathway reveal a pentacoordinate reaction intermediate and an unexpected final product [J]. *Journal of Molecular Biology*, **339**: 805—820

Leiros I, Secundo F, Zambonelli C *et al.*, 2000. The first crystal structure of a phospholipase D [J]. *Structure*, **8**: 655—667

Lerchner A, Mansfeld J, Kuppe K *et al.*, 2006. Probing conserved amino acids in phospholipase D (*Brassica oleracea* var. *capitata*) for their importance in hydrolysis and transphosphatidylation activity [J]. *Protein Engineering Design and Selection*, **19**: 443

Lerchner A, Mansfeld J, Sch ffner I *et al.*, 2005. Two highly homologous phospholipase D isoenzymes from *Papaver somniferum* L. with different transphosphatidylation potential [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1737**: 94—101

Liu M, Gutowski S, Sternweis P, 2001. The C terminus of mammalian phospholipase D is required for catalytic activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 5556

Mansfeld J, Ulbrich-Hofmann R, 2009. Modulation of phospholipase D activity in vitro [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1791**: 913—926

Masayama A, Takahashi T, Tsukada K *et al.*, 2008. Streptomyces phospholipase D mutants with altered substrate specificity capable of phosphatidylinositol synthesis [J]. *ChemBioChem*, **9**: 974—981

Moraru I, 1992. Phospholipase D signaling in ischemic heart [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of*

Disease, **1139**: 148—154

Morris A, Engebrecht J, Frohman M, 1996. Structure and regulation of phospholipase D [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, **17**: 182

Morris A, Frohman M, Engebrecht J, 1997. Measurement of phospholipase D activity [J]. *Analytical Biochemistry*, **252**: 1—9

Motes C, Pechter P, Yoo C *et al.*, 2005. Differential effects of two phospholipase D inhibitors, 1-butanol and N-acylethanolamine, on in vivo cytoskeletal organization and Arabidopsis seedling growth [J]. *Protoplasma*, **226**: 109—123

Munnik T, Arisz SA, De Vrije T *et al.*, 1995. G protein activation stimulates phospholipase D signaling in plants [J]. *The Plant Cell*, **7** (12): 2197—2210

Nakamura J, Lattimer S, Greene D, 1994. Transphosphatidylation of sugar alcohols and its implications for the pathogenesis of diabetic complications [J]. *Diabetologia*, **37**: 1147—1153

Ogino C, Daido H, Ohmura Y *et al.*, 2007. Remarkable enhancement in PLD activity from *Streptoverticillium cinnamoneum* by substituting serine residue into the GG/GS motif [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, **1774**: 671—678

Omodeo-Sale F, Lindi C, Palestini P *et al.*, 1991. Role of phosphatidylethanol in membranes. Effects on membrane fluidity, tolerance to ethanol, and activity of membrane-bound enzymes [J]. *Biochemistry*, **30**: 2477

Papahadjopoulos D, Vail W, Pangborn W *et al.*, 1976. Studies on membrane fusion. II. Induction of fusion in pure phospholipid membranes by calcium ions and other divalent metals [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **448**: 265—283

Pappan K, Wang XM, 1999. Plant Phospholipase Dα is an acidic phospholipase active at near-physiological Ca^{2+} concentrations [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **368** (2): 347—353

Peters NT, Logan KO, Miller AC *et al.*, 2007. Phospholipase D signaling regulates microtubule organization in the fucoid alga Silvetia compressa [J]. *Plant and Cell Physiology*, **48**: 1764—1774

Ponting C, Kerr I, 1996. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues [J]. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, **5**: 914

Potocky M, Eliá M, Profotová B *et al.*, 2003. Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth [J]. *Planta*, **217**: 122—130

Qin C, Wang X, 2002. The Arabidopsis phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLDzeta 1 with distinct regulatory domains [J]. *Plant Physiology*, **128**: 1057

Rakhimov MM, 1989. A new and rapid synthesis of phospholipids [J]. *Fiziol Rast*, **36** (3): 502

Rydzewska G, Jurkowska G, Gabryelewicz A *et al.*, 1996. Phospholipase D mediated transphospatidylation as a possible new pathway ofethanol metabolism in isolated rat pancreatic acini [J]. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **47**: 385—395

Sastry PS, Kates M, 1965. Biosynthesis of lipids in plants: I. Incorporation of orthophosphate-32 P and glycerophosphate-32 P into phosphatides of chlorella vulgaris during photosynthesis [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, **43**: 1445—1453

Sato R, Itabashi Y, Hatanaka T *et al.*, 2004. Asymmetric in vitro synthesis of diastereomeric phosphatidylglycerols from phosphatidylcholine and glycerol by bacterial phospholipase D [J]. *Lipids*, **39**: 1013—1018

Secundo F, Carrea G, D'Arrigo P *et al.*, 1996. Evidence for an essential lysyl residue in phospholipase D from *Streptomyces* sp. by modification with diethyl pyrocarbonate and pyridoxal 5-phosphate [J]. *Biochemistry*, **35**: 9631—9636

Shuto S, Ueda S, Itoh H *et al.*, 1986. Synthesis of 5'-phosphatidylnucleosides by phospholipase D-catalyzed transphosphatidylation [J]. *Nucleic Acids Symp Ser*, 73—76

Sung T, Roper R, Zhang Y *et al.*, 1997. Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity [J]. *The EMBO Journal*, **16**: 4519—4530

Tsunoda M, Akira S, 1988. Method of Producing Phosphatidic Acid Derivatives with Immobilized Phospholipase D [P]. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, JP63 91, 089

Uesugi Y, Arima J, Iwabuchi M *et al.*, 2007. C-terminal loop of Streptomyces phospholipase D has multiple functional roles [J]. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, **16**: 197

Uesugi Y, Mori K, Arima J *et al.*, 2005. Recognition of phospholipids in Streptomyces phospholipase D [J]. *Journal of Biological Chemistry*, **280**: 26143

Ulbrich-Hofmann R, Lerchner A, Oblozinsky M *et al.*, 2005. Phospholipase D and its application in biocatalysis [J]. *Biotechnology Letters*, **27**: 535—544

Vail W, Stollery J, 1979. Phase changes of cardiolipin vesicles mediated by divalent cations [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **551**: 74—84

van Blitterswijk WJ, Hilkmann H, 1993. Rapid attenuation of receptor-induced diacylglycerol and phosphatidic acid by phospholipase D-mediated transphosphatidylation: formation of bisphosphatidic acid [J]. *The EMBO Journal*, **12** (7): 2655—2662

Walton PA, Goldfine H, 1987. Transphosphatidylation activity

in Clostridium butyricum. Evidence for a secondary pathway by which membrane phospholipids may be synthesized and modified [J]. *Journal of Biological Chemistry*, **262**: 10355—10361

Wang X, Xu L, Zheng L, 1994. Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L [J]. *Journal of Biological Chemistry*, **269**: 20312—20317

Wang X, Devaiah SP, Zhang W *et al.*, 2006. Signaling functions of phosphatidic acid [J]. *Progress in Lipid Research*, **45**: 250—278

Williams SA, YCH, Panagia V, 1995. Phospholipase D is depressed in diabetic cardiomyopathy [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **27** (5): A30

Wilschut J, Düzgüne N, Papahadjopoulos D, 1981. Calcium/magnesium specificity in membrane fusion: kinetics of aggregation and fusion of phosphatidylserine vesicles and the role of bilayer curvature [J]. *Biochemistry*, **20**: 3126

Xie Z, Ho W, Exton J, 2001. Conserved amino acids at the C-terminus of rat phospholipase D1 are essential for enzymatic activity [J]. *European Journal of Biochemistry*, **267**: 7138—7146

Yang H, Roberts M, 2003. Phosphohydrolase and transphosphatidylation reactions of two Streptomyces phospholipase D enzymes: Covalent versus noncovalent catalysis [J]. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, **12**: 2087

Yang SF, Freer S, Benson AA, 1967. Transphosphatidylation by phospholipase D [J]. *Journal of Biological Chemistry*, **242**: 477—484

* * * * * * * * * * * * * * *

植物 DNA 条形码研究项目2010 年度会议在昆明成功召开

中国科学院大科学装置开放研究项目——“依托种质资源库的植物 DNA 条形码研究”2010 年度会议于 2010 年 8 月 12～13 日在中国科学院昆明植物研究所成功召开。来自中科院昆明植物研究所、中科院植物研究所、中科院华南植物园、中科院武汉植物园、江苏省中科院植物研究所、广西植物所、中科院西双版纳热带植物园、深圳仙湖植物园、中国医科院药用植物研究所、中国中医科学院中药研究所、浙江大学、四川大学、上海交通大学、华东师范大学、香港中文大学、兰州大学、江西农业大学、四川农业大学等 18 个科研院所和高校的 60 余位专家和学者参加了此次会议。

项目首席科学家李德铢研究员首先介绍和回顾了国际上植物 DNA 条形码的研究进展和动态，并介绍了该项目从 2009 年 8 月开始实施以来所开展的主要工作和运行情况。他提出：植物 DNA 条形码研究是中国植物学家面临的历史性机遇和挑战，建立自主的平台，研究重要植物类群 DNA 条形码，对生物多样性保护和持续利用以及社会经济发展具有重要意义，并希望各专题负责人通过此次会议能够达到“交流、提高、统一、共享”的目标。

该项目分为四个主要课题，由王红研究员和陈之端研究员主持的“重要生物类群的采集及 DNA 条形码的测定与分析”课题，其下 53 个专题负责人或研究骨干汇报了各自的进展情况，并对项目执行过程中取得的经验、遇到的问题和下一步的工作计划进行了广泛地交流，同时向项目依托单位中科院昆明植物研究所提交了相关研究材料和信息。该课题取得了重要的阶段性成果，完成了以中国为主要分布中心的 50 科、60 属、1200 余种和 4000 余份的 DNA 条形码的测序和分析，高连明副研究员、杨俊波高级工程师和王雨华研究员分别代表各自主持的专题做了工作进展报告。“DNA 条形码的分子标记的筛选”专题：利用多个 DNA 条形码候选片段对苔鲜植物、裸子植物和被子植物的主要类群进行了条形码的筛选和评价，并利用叶绿体全基因组序列的比较筛选可用于植物 DNA 条形码研究的潜在片段，该研究取得了良好进展；“种质资源库已保存的野生植物 DNA 条形码测定与分析”专题：完成 130 科、200 属、1000 余种和 3000 多份的 DNA 条形码的测定和分析，并利用 DNA 条形码技术更正了一些分类上的错误鉴定；“DNA 条形码数据库体系的建立”专题：构建了植物 DNA 条形码数据管理系统（http://159.226.3.34：8080），并已正式向项目组内开放和试运行。目前，上述部分研究成果已在“Molecular Phylogenetics and Evolution”、“Molecular Ecology Resources”和“Plant Systematic and Evolution”等国际重要学术刊物上发表。

会议结束后，项目组组织各专题负责人和研究骨干，着重在“植物标本的采集规范和图片的质量要求”、“植物 DNA 条形码研究材料采集策略、规范与要求”、“植物 DNA 条形码的选择与数据标准”和“植物 DNA 条形码数据提交系统”等方面进行了相关技术培训，与会人员对条形码数据规范和新的数据管理系统进行了认真学习和讨论。

中国科学院昆明植物研究所　王红